

Posudek oponenta na diplomovou práci	
<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: RNDr. Jana Šmahelová
	Datum: 2. 6. 2017
Autor: Bc. Alžběta Sekavová	
Název práce: Příprava polyomavirových nanostruktur pro diagnostiku BK virových infekcí Preparation of polyomaviral nanostructures for diagnostics of BK virus infection	
<b>Cíle práce</b> jsou jasně definovány v samostatné kapitole. Autorka chce ve své diplomové práci navrhnout, připravit a otestovat specifické antigeny (VLP) pro sérologickou diagnostiku virových infekcí subtypy BKV-I a BKV-IV. Je definováno šest dílčích cílů.	
<b>Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému?</b> ANO Rozsah práce (počet stran): 90 stran práce, 6 stran příloh a seznam literárních zdrojů Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? ANO Je uveden seznam zkratk? ANO	
<b>Literární přehled:</b> Odpovídá tématu? ANO Je napsán srozumitelně? ANO, je stručný a výstižný Použil(a) autor(ka) v řešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO, autorka čerpala z relevantních zdrojů, použila však nejednotný citační styl. Jak v textu, tak v přehledu citací je u prací od více autorů někdy uveden pouze první autor někdy dva i více. Nejednotně jsou uvedeny iniciály či křestní jména autorů, některé citace v textu dokonce křestním jménem začínají.	
<b>Materiál a metody:</b> Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? přibližně 30 metod Jsou metody srozumitelně popsány? ANO, s výjimkou testů ELISA	
<b>Experimentální část:</b> Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? ANO, především dokumentace přípravy rekombinantních proteinů a VLP je velmi pěkná a podrobná. Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO, u experimentů, které autorka neprováděla sama, je to uvedeno.	
<b>Diskuze:</b> Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO	
<b>Závěry (Souhrn):</b> Jsou výstižné? ANO	

**Formální úroveň práce** (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Práce je napsaná v angličtině, pokud mohu posoudit, jazyková úroveň je dobrá. Práce však působí dojmem, že byla dokončována v časové tísní, obsahuje poměrně dost formálních nedostatků. Po úpravách textu zůstaly některé věty částečně neupravené – např. str. 5 „...*polio vaccine against in the years..*“, „...*after transplant..*“, místo odkazů na obrázky či kapitoly několikrát zůstaly v textu „???“ nebo „()“, v diskuzi poznámka v češtině „(*odkaz na kapitolu*)“.

Za velice zdařilé považuji snímky z elektronové mikroskopie připravovaných VLP.

Zhotovovala jste je sama? Stejně tak vložené přehledné schéma přípravy a izolace virových VLP (obr. 5.1) je pro čtenáře a orientaci v práci velmi přínosné.

Obrazová dokumentace je kvalitní, výhrady mám pouze k obr. 5.21, jehož text v obrázku je nečitelný.

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

**Autorka Bc. Alžběta Sekavová ve své diplomové práci prokázala, že se velmi dobře orientuje v problematice přípravy rekombinantních virových proteinů. V průběhu experimentální práce se dokázala vyrovnat s nezdary, které laboratorní práce přináší. Podařily se jí připravit virové partikule SV40, BKV-I a BKV-IV a optimalizovat nové postupy jejich izolace. Při přípravě rekombinantních virových partikulí pro sérologické rozlišení protilátek proti subtypům BKV, mix-BKV-I a -IV, nebyla zcela úspěšná, ale v obsáhlé diskuzi navrhuje další postupy, které by mohly vést k řešení problému. Dále pomocí imunologických metod a připravených rekombinantních antigenů charakterizovala získaná hyperimunní králíčí séra. Za ne zcela přesvědčivé považuji provedení a interpretaci experimentů na ověření reaktivity lidských sér. Tento dílčí cíl proto považuji za splněný pouze částečně. Práci doporučuji k obhajobě.**

**Otázky a připomínky oponenta:**

Připomínky:

1. V obsahu není zahrnut odkaz na kapitolu *Bibliography*.
2. V seznamu chemikálií a materiálů jsou některé uvedeny duplicitně (Sf-9 cell line, primer Ev-BK-start- fw), naopak plasmidy p734A a pMJG v práci nebyly použity. V rozpisech směsí enzymatických reakcí je obvyklé u enzymů uvádět počet U/reakci, ne objem. V angličtině se tisíce oddělují desetinnou čárkou.
3. U grafického znázornění výsledků testů ELISA na obr. 5.40 chybí popisky os, na obr. 5.43, 5.50 a 5.51 jsou chybně uvedeny jednotky „*well/ng*“, část legendy obr. 5.50 a zejména 5.51 by spíše patřila do textu kapitoly *Results*.
4. Grafy 5.45 a 5.46 by podle mého názoru mohly být sloučeny do jednoho, uvedené výsledky se částečně překrývají a jsou totožné na obou grafech.
5. Výsledky znázorněné na obr 5.43 jsou pro mě nesrozumitelné. Není zřejmé, jak se liší séra 6029 a 6030 od nesaturovaných sér 6015 a 6023. Výsledky saturačních experimentů navíc uvádíte až dále v textu.
6. Část Tab. 5.14 na konci kapitoly *Results*, která přináší charakteristiky použitých experimentálních sér, by měla být zařazena již do kapitoly *Material and methods*. Není uvedeno sérum zdravého dárce JZS a BKV negativní sérum.

Otázky:

1. Uvádíte, že imunoanalýza VLP na Western blotu (obr. 5.37) ukázala větší velikost proteinu mix-BKV-IV než jste očekávala. Jaká je tedy očekávaná velikost tohoto proteinu? Můžete okomentovat rozdílnou velikost proteinů VP1 na obr. 5.37 a 5.41?
2. K popisu provedení pokusů ELISA - v metodice uvádíte, že jste měřila absorbanci (při

jaké vlnové délce?) v určitých časových intervalech. Jaká data měření jsou tedy znázorněna v grafech? Proč jste reakci nezastavovala? Nedocházelo při proměření destičky k časovým prodlevám, které by ovlivnily naměřené hodnoty? Prováděla jste párová měření vzorků, opakovala jste pokusy? Jaké jste použila negativní kontroly pro měření?

4. Na obr. 5.47 vynášíte záporné hodnoty absorbance. Jak jste k těmto hodnotám dospěla?

5. Na obr. 5.49 ukazujete výsledky testů ELISA při vysycovacích experimentech s králíčími hyperimunními séry. Proč považujete reakci Rb $\alpha$ -BKV-I séra po saturaci s BKV-I VLP za eliminaci zkřížené reaktivity (obr. 5.49A)?

6. Pro ověření reaktivity Vámi připravených rekombinantních antigenů jste použila pouze 4 lidská séra. Jsou to séra pacientů? Jakými testy byla séra předem charakterizována? Pro saturační pokusy jste použila také sérum zdravého dárce JZS. Jaká je jeho charakteristika?

7. Virové partikule SV40 VLP nebyly pro část experimentů k dispozici. Plánujete ještě dokončení pokusů?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

Navrhnu po obhajobě.

☐ výborně   ☐ velmi dobře   ☐ dobře   ☐ nevyhověl(a)

Podpis oponenta: